



PATENT APPLICATION

TECH CENTER 1600/2900

APR 08 2002

RECEIVED

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

MOLINA et al.

Group Art Unit: Unknown

Application No.: 10/003,463

Filed: December 6, 2001

Attorney Dkt. No.: 024518-00001

For: PREPARATIONS THAT POTENTIATE IMMUNOGENICITY IN LOW
IMMUNOGENIC ANTIGENS

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

April 5, 2002

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign application/s in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

Cuban Patent Application No. 285/2000 filed on December 6, 2000
Cuban Patent Application No. 167/2001 filed on July 12, 2001

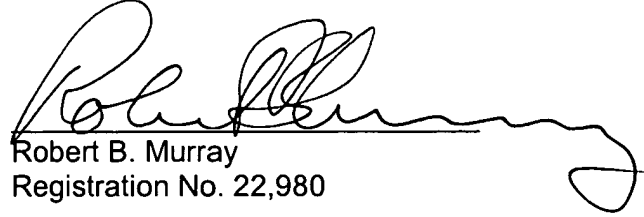
In support of this claim, certified copy(ies) of said original foreign application/s is filed herewith.

The undersigned has been advised that the Cuban Patent Office has changed the serial number of the Cuban Patent Application filed on July 12, 2001 from 166/2001 to 167/2001. It is planned to file a substitute declaration to reflect this change.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these/this document.

Please charge any fee deficiency or credit any overpayment with respect to this paper to Deposit Account No. 01-2300.

Respectfully submitted,



Robert B. Murray
Registration No. 22,980

Customer No. 004372
ARENT FOX KINTNER PLOTKIN & KAHN, PLLC
1050 Connecticut Avenue, N.W.,
Suite 400
Washington, D.C. 20036-5339
Tel: (202) 857-6000
Fax: (202) 638-4810

RBM:sj



REPÚBLICA DE CUBA

167/2002
TECH CENTER 1600/290
APR 08 2002
OFICINA CUBANA
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

RECEIVED

Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número ciento sesenta y siete del año dos mil uno del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **PREPARACIONES PARA POTENCIAR LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS POCO INMUNOGÉNICOS**, con fecha doce de julio de dos mil uno, a las cuatro horas pasado meridiano, por Olga Lidia Moreno Samper, Agente Oficial, ciudadana cubana, a nombre y en representación de CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR, cuya invención fue creada por Luis Enrique Fernández Molina, Belinda Sánchez Ramírez, Eduardo Raúl Suárez Pestana, Anabel de la Barrera Aira, Circe Mesa Pardillo, Joel de León Delgado, Yildian Díaz Rodríguez y Rolando Pérez Rodríguez.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones, el Resumen y las Figuras que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Olga Lidia Moreno Samper, Agente Oficial, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los veintiséis días del mes de marzo de dos mil dos.


Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General

PREPARACIONES PARA POTENCIAR LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS POCO INMUNOGÉNICOS.

Sector Técnico.

La presente invención se relaciona con la rama de la medicina humana y en especial con vacunas protectoras y/o terapéuticas para enfermedades infecciosas, autoinmunes y el cáncer, y particularmente proporciona composiciones vacunales que permiten la generación o el incremento de la respuesta inmunitaria contra antígenos poco inmunogénicos.

Técnica Anterior.

El poco éxito logrado hasta ahora en la prevención y tratamiento de un grupo de enfermedades infecciosas, el cáncer y las enfermedades autoinmunes con vacunas se debe a combinaciones de factores diversos, principalmente la baja inmunogenicidad de antígenos relevantes, el desconocimiento de como manipular la regulación del sistema inmunitario y las estrategias de evasión de patógenos y tumores, entre ellas la inmunosupresión del hospedero.

Son conocidos dentro del estado de la técnica como antígenos poco inmunogénicos aquellos péptidos, polipéptidos y proteínas (o sus correspondientes secuencias de ADN) presentes en tumores y tejidos normales, o asociados a patógenos que producen infecciones crónicas mediante la evasión de la acción del sistema inmunitario.

Entre los antígenos poco inmunogénicos los receptores de factores de crecimiento con actividad quinasa en residuos de tirosina han mostrado tener una estrecha relación con el desarrollo de tumores y de metástasis tumorales, y se ha probado su valor en algunos casos como indicadores de mal pronóstico en cáncer. Tal es el caso de receptores como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R, siglas en inglés) o HER-1, el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2), y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R, siglas en inglés).

La sobre expresión de estos receptores en algunos tipos de neoplasias, fundamentalmente de origen epitelial, ha sido blanco de atención en la inmunoterapia del cáncer. Tal es el caso de tumores de mama, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, próstata y tumores de cabeza y cuello. La presencia de EGF-R ha probado ser una indicación de mal pronóstico en cáncer de mama (Pérez

R *et al.* 1984. *Breast Cancer and Treatment* 4:189-193). Aún cuando no se conoce todavía el papel que juega el sistema del EGF/EGF-R en la regulación del crecimiento tumoral, se ha sugerido que la expresión del EGF-R en células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación autocrina que conduce a la proliferación descontrolada de dichas células (Schlessinger J *et al.* (1983) *Crit Rev Biochem* 14 (2):93-111).

Por su alta expresión en tumores, el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico ha sido blanco de inmunoterapia pasiva (IP) con anticuerpos monoclonales en forma nativa, asociados a drogas, toxinas, o isótopos radiactivos (Vollmar AM *et al.* (1987) *J Cell Physiol* 131:418-425). Varios ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (AcMs) se están llevando a cabo y algunos han mostrado resultados promisorios, como es el caso del ensayo clínico con el AcM C225 en cáncer de mama, de células pancreáticas y de células renales en fase II y cabeza-cuello en fase III (Mendelsohn J *et al.* (1999) American Society of Clinical Oncology Meeting). Otro ensayo clínico de Fase II con buenos resultados es el ensayo efectuado con el AcM IOR egf/r3 en tumores de cabeza y cuello (Crombet T *et al.* (2000) *Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical*, manuscrito aceptado).

En cambio la inmunoterapia activa específica (IAE) utilizando como blanco el EGF-R no ha sido nunca desarrollada, siendo las causas de esto su baja inmunogenicidad como molécula propia y su amplia expresión en los tejidos del organismo, lo cual ha determinado el temor de los inmunólogos a considerar esta opción (Disis ML and Cheever MA (1996) *Current Opinion in Immunology* 8:637-642). La IAE tiene ventajas sobre la IP por cuanto ésta última no activa la rama efectora celular específica de la respuesta inmune, y su efecto depende de la vida media de los anticuerpos utilizados, siendo generalmente necesario reinfusiones continuadas para lograr los efectos deseados.

En el desarrollo de vacunas eficaces, los vehículos y adyuvantes son los responsables de superar la baja inmunogenicidad de antígenos relevantes mediante la regulación convenientemente el sistema inmunitario y la conjura de estrategias de evasión de patógenos y tumores. Es por ello que la búsqueda de nuevos sistemas de vehiculización y adyuvación constituyen hoy una importante área de investigación.

En los últimos años las nuevas teorías y conocimientos emergentes sobre la regulación del sistema inmune han abierto nuevos campos de experimentación para la búsqueda de nuevos vehículos y adyuvantes de mayor eficiencia. Fearon, et al. (Science, Vol. 272, pp 50-53, 1996) han enseñado que una inmunidad protectora es el resultado de la interrelación de dos sistemas cardinales: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Las células de la inmunidad adquirida no pueden distinguir las estructuras que requieren respuesta inmune de aquellas que no y por tanto necesitan ser instruidas por las células del sistema inmune innato. Un vínculo esencial entre la inmunidad innata y la adquirida es proporcionado por las Células Presentadoras de Antígenos (CPA), entre las cuales las Células Dendríticas (DC, siglas en inglés) son las más eficientes inductoras de respuestas inmunes tanto primarias como secundarias. En particular las DC son cruciales debido a que son las únicas CPA capaces de activar linfocitos T vírgenes.

Recientemente se han identificado moléculas relacionadas con la inmunidad innata que podrían considerarse como una nueva generación de vehículos y adyuvantes, debido a que tienen la capacidad de madurar las DC y mediar la presentación cruzada de antígenos acoplados a ellas.

De interés en el estado del arte previo, se localizan una serie de trabajos. Giroir, (Crit. Care Med., Vol. 5, pp 780-789, 1993), Cella, et al. (Nature, Vol. 388, pp 782-787, 1997) y Hailman, et al. (J. Exp. Med., Vol. 79, pp 269-277, 1994) enseñan como la interacción del lipopolisacárido (LPS) con los sistemas de reconocimiento de la inmunidad innata es la más potente de todas, estimulando en monocitos, macrófagos y neutrófilos la producción de citoquinas y de mediadores proinflamatorios, aumentando además la expresión de moléculas de adhesión. Estas citoquinas inflamatorias son muy importantes en la respuesta a infecciones y tumores, pero una excesiva secreción de las mismas conduce al 'shock séptico', lo cual puede ser mortal para los pacientes e impide el uso del LPS como adyuvante vacunal. La respuesta está mediada por el complejo que forma el LPS con la proteína unidora de LPS (LBP, siglas en inglés), el cual a su vez interacciona con la molécula CD14. Esta molécula facilita la interacción del LPS con las moléculas de señalización llamadas receptores Toll (TLR). Numerosas evidencias apuntan al receptor Toll 4 (TLR4) como la molécula de la familia Toll involucrada en la transducción de la señal del LPS.

Ulrich, et al (In Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach p 495, edited by MF Powel and MJ Newman, Plenum Press, New York. 1995), Tholen, et al. (Vaccine, Vol.16, p 708. 1998), De Becker, et al. (Int. Immunol, Vol.12, pp 807-815. 2000) indican como existen derivados no tóxicos de LPS, como es el caso del

5 Monofosforil Lípido A (MPLA, siglas en Inglés), que tiene actividad adyuvante para las ramas celular y humoral de la respuesta inmune y ha sido administrado a humanos en varios ensayos clínicos. Aunque se sostiene que el MPLA mantiene las propiedades inmunoestimuladoras del LPS, estos autores demostraron que el MPLA induce migración y maduración funcional de las DC in vivo, pero a niveles

10 inferiores a los observados con el LPS.

Tamura, et al (Science, Vol. 278, pp 117-120. 1997) y Binder, et al (Nature Immunol., Vol. 1, pp 151-155. 2000) han reportado como las proteínas de estrés térmico (HSP) son potentes vehículos para la estimulación de la inmunidad celular a través del fenómeno de presentación cruzada de sus antígenos acompañantes. Las

15 HSP obtenidas de tumores han mostrado interesantes efectos antitumorales en distintos modelos. La identificación del CD91 como el receptor para la HSP gp96, podría reflejar la presencia de una vía específica de captura de HSP en las DC que ha evolucionado para reclutar eficientemente péptidos asociados a antígenos, agentes infecciosos o células dañadas, para su presentación en Complejo Mayor de

20 Histocompatibilidad tipo I (MHC I, siglas en inglés). El empleo de HSP como vehículos para vacunas, sin embargo, tiene el inconveniente de que hay que obtenerlas de la fuente de origen, por ejemplo, de los tumores. Esto hace trabajoso y costoso el procedimiento y nunca se sabe realmente quien es el antígeno que ha sido responsable del efecto.

25 Hartmann, et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, pp 9305-9310. 1999), Hemmi, et al (Nature, Vol. 6813, pp 740-5. 2000), Sparwasser, et al. (Eur. J. Immunol. Vol.12, pp 3591-3597. 2000), Hochreiter, et al. (Int. Arch. Allergy Immunol., Vol 124, pp 406-410. 2001) y Deng, et al. (Arthritis Res. Vol 3, pp 48-53. 2001) muestran como entre las moléculas asociadas a la inmunidad innata, identificadas como

30 inductoras de maduración de las DC, se encuentran las secuencias CpG de ADN bacteriano. Recientemente se demostró que la respuesta celular ante las secuencias CpG es mediado por TLR9, lo que indica que este receptor es capaz de distinguir ADN bacteriano de ADN propio. La inducción de linfocitos T citotóxicos

(CTL) contra distintos antígenos solubles ha sido reproducida en ratones modificados genéticamente negativos para los marcadores CD40, CD4 o MHC II. Esto implica que la activación de CTL mediada por CpG incluso ocurre en ausencia de la ayuda de las células T CD4, lo cual confiere a este tipo de molécula especiales propiedades adyuvantes. No obstante la capacidad "in vivo" de las secuencias CpG de desviar un patrón de respuesta Th2 a Th1 es totalmente dependiente de la naturaleza del antígeno y de las condiciones de inmunización, siendo esto particularmente válido cuando son proteínas. Esto puede constituir una limitante al empleo eficaz de los oligonucleótidos de CpG como adyuvante, sobre todo en huéspedes inmunocomprometidos. También se ha descrito que las secuencias CpG bacterianas pueden inducir artritis.

Jeannin, et al. (Nature Immunol., Vol. 6, pp 502-509. 2000) y Miconnet, et al. (J. Immunol., Vol. 166, pp 4612-4619. 2001) particularmente encontraron propiedades inmunoestimuladoras importantes de la proteína OmpA de la membrana externa de la bacteria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*. Los experimentos realizados con esta proteína expresada de forma recombinante (kpOmpA) mostraron que ella se une e induce maduración completa de las DC, utilizando como vía de señalización la molécula TLR2. Otra propiedad importante que presenta esta proteína es su capacidad de conducir antígenos a la vía de presentación de clase I, siempre y cuando estos antígenos se le acoplen covalente o hidrofóticamente. Esto es precisamente su mayor limitación como vehículo vacunal ya que las técnicas de conjugación covalente tienen el inconveniente de las modificaciones químicas tanto a la propia proteína como al antígeno y la unión hidrofóbica solo permite trabajar con el sub-conjunto de los antígenos hidrófobos.

Lowell describió en la patente No. U.S. 5,726,292 un sistema inmunopotenciador para incrementar la inmunogenicidad de péptidos, polipéptidos y proteínas, la cual se puede considerar el prototipo más cercano a la presente invención. En la mencionada patente, las composiciones se caracterizan porque los antígenos son modificados químicamente mediante la adición de al menos un residuo de cisteína y posterior conjugación de una molécula de ácido graso alifático o un péptido hidrófobo. Posteriormente los antígenos modificados se acomplejan con un proteosoma mediante procesos de diálisis o liofilización. En particular estas composiciones no incluyen glicósidos.

Divulgación de la invención.

La novedad de la presente invención consiste en proporcionar formulaciones que permiten hacer inmunogénicos péptidos, polipéptidos, proteínas, sus correspondientes secuencias de ADN y células blanco de interés vacunal, sin
5 necesidad de introducir cambios estructurales en dichos antígenos, mediante su asociación con proteoliposomas de muy pequeña talla (Very Small Size Proteoliposomes, VSSP siglas en inglés) de la bacteria *Neisseria meningitidis*, que contienen incorporados potentes ligandos de la inmunidad innata y gangliósidos.

Esta invención muestra como el vehículo inmunopotenciador consiste precisamente
10 en los proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP) obtenidos a partir de la asociación del Complejo Proteico de la Membrana Externa (CPME) de la bacteria Gram-negativa *Neisseria meningitidis* con gangliósidos.

Mediante la presente invención se muestra como las formulaciones descritas son especialmente eficaces cuando se seleccionan antígenos poco inmunogénicos y se
15 administran a huéspedes inmunocomprometidos.

Un objeto de esta invención es proporcionar composiciones inmunogénicas que contienen péptidos, polipéptidos, proteínas, sus correspondientes secuencias de ADN, células blanco o sus lisados como antígenos, y proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP), los cuales se forman al unir el Complejo de Proteínas de la
20 Membrana Externa (CPME) de la bacteria *Neisseria meningitidis* con gangliósidos, mediante enlaces hidrófobos. Adicionalmente se postula que estas composiciones pueden formularse solas o formando emulsiones con el adyuvante incompleto de Freund (AIF) y también ser liofilizadas.

Otro objeto de la invención es proporcionar composiciones inmunoestimuladoras
25 capaces de generar respuestas inmunes antígeno-específicas incluso en huéspedes inmunocomprometidos, como son los que padecen de cáncer e infecciones virales crónicas. En estos pacientes, la administración de las composiciones vacunales descritas en esta invención permite restaurar la funcionalidad de sectores de su sistema inmunitario.

30 Adicionalmente las composiciones vacunales descritas en la presente invención, constituyen una solución al problema de la inmunogenicidad de los receptores de factores de crecimiento y su impacto en el tratamiento de los tumores, debido a que estos receptores con actividad tirosina quinasa y los gangliósidos que

específicamente se asocian a éstos en forma de agrupaciones moleculares de membrana, se presentan simultáneamente al sistema inmune del hospedero en el contexto de las señales de peligro aportadas por el VSSP, necesarias para activar a las células dendríticas (DC, siglas en inglés) de forma efectiva, y producir
 5 presentación cruzada. Estas composiciones vacunales, además de presentarle sus componentes al sistema inmune, simulando las asociaciones moleculares en que ellos se encuentran naturalmente en las células tumorales, hacen innecesario el empleo de técnicas químicas de conjugación de proteínas que generan nuevos epítopes inmunodominantes espúreos.

10 Por otro lado esta solución tecnológica permite usar las estructuras íntegras de los receptores, favoreciendo la solución del problema de la restricción genética de la inmunodominancia, a diferencia de otras que han usado péptidos derivados y que pueden presentar más limitaciones en este sentido.

Más específicamente la invención proporciona composiciones vacunales para el
 15 tratamiento del cáncer. Dichas composiciones vacunales contienen como principio activo uno o más receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares, pudiendo o no contener estos últimos los dominios transmembranarios, empleando como vehículo vacunal proteoliposomas de muy baja talla derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* (VSSP) y los gangliósidos que se asocian específicamente con dichos
 20 receptores, formando agrupaciones moleculares de membrana. Estas composiciones vacunales pueden contener adicionalmente un adyuvante apropiado. Las composiciones vacunales de la invención pueden ser usadas en la inmunoterapia activa específica de tumores como cáncer de próstata, colon, pulmón,
 25 mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, gliomas, así como en enfermedades crónicas no transmisibles.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas para potenciar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos, cuyos componentes son:

- 30 (A) uno o más antígenos poco inmunogénicos;
- (B) un vehículo vacunal que consiste en proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de una bacteria Gram-negativa, los cuales contienen gangliósidos incorporados; y

(C) eventualmente uno o más adyuvantes.

Las composiciones de la invención permiten potenciar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos, los cuales pueden ser péptidos, polipéptidos, proteínas, o sus correspondientes secuencias de ácidos nucleicos, así como células
5 blanco de interés vacunal, o sus lisados, o la mezcla de ellos.

Dentro de los antígenos poco inmunogénicos, los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares pueden ser empleados. Dichos dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento pueden contener o no su región transmembrana.

10 Los receptores de factores de crecimiento que pueden ser empleados para incrementar su inmunogenicidad son el HER-1, HER-2, R-PDGF o cualquiera de sus variantes que contenga el dominio extracelular con y sin región transmembrana.

Los proteoliposomas del vehículo vacunal de la presente invención se obtienen del complejo de proteínas de la membrana externa de una bacteria gram-negativa,
15 seleccionándose de forma preferida la bacteria *Neisseria meningitidis*, la cual puede ser una cepa salvaje o modificada genéticamente.

En las composiciones de la invención los proteoliposomas del vehículo vacunal con gangliósidos incorporados se obtienen mediante la incorporación hidrofóbica de dichos gangliósidos al complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria*
20 *meningitidis*, pudiéndose emplear para este fin los gangliósidos GM1, GM3 o sus variantes N-glicosiladas.

Las composiciones de la invención contienen adicionalmente un adyuvante, que puede ser de naturaleza oleosa o un polipéptido natural o recombinante.

El adyuvante de naturaleza oleosa empleado es preferiblemente el Adyuvante
25 Incompleto de Freund o Montanide ISA 51.

Asimismo cuando se emplea un adyuvante polipeptídico, éste puede ser una citosina como el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos, o una quimiocina.

Las composiciones de la invención son útiles para la prevención y tratamiento del
30 cáncer, particularmente cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, cerebro, gliomas, así como de enfermedades crónicas no transmisibles.

Igualmente puede ser empleadas para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas de origen viral y bacteriano, y dentro de estas, puede ser empleada en el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, así como para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

- 5 La presente invención aporta formulaciones que confieren inmunogenicidad a péptidos, proteínas recombinantes o naturales, lisados celulares, células intactas y ácidos nucleicos, poco inmunogénicos. Las formulaciones inmunoestimuladoras pueden ser definidas como aquellas capaces de estimular tanto la respuesta humoral como la celular contra un antígeno en particular. Además, estas
10 formulaciones tienen la característica peculiar de rescatar la inmunidad de individuos inmunocomprometidos, como son los que padecen de cáncer e infecciones virales crónicas o determinados tipos de enfermedades autoinmunes.

Esta invención muestra como el vehículo inmunopotenciador consiste en proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP) obtenidos a partir de la asociación
15 del Complejo Proteico de la Membrana Externa (CPME) de la bacteria Gram-negativa, *Neisseria meningitidis* con gangliósidos incorporados. Los componentes del CPME se someten a un proceso de diálisis que dura entre 2 y 15 días, durante el cual se le incorporan gangliósidos glicolilados y/o acetilados. Con la incorporación de los gangliósidos al complejo de membrana externa se obtiene una preparación
20 no vesicular, de muy pequeña talla molecular, invisible al microscopio electrónico, soluble y de alta flotabilidad.

Los VSSP de la presente invención muestran propiedades inmunológicas sorprendentes tales como una marcada capacidad de madurar a las células dendríticas, y de inmunorrescatar pacientes inmunosuprimidos. Los VSSP se
25 obtienen según se describe en las patentes cubanas 131/93 y 130/97, en las patentes USA 5,788,985 y USA 6,149,921, así como en el artículo Estevez, *et al.* (Vaccine, Vol. 18, pp 190-197. 1999).

Los péptidos antigénicos de interés pueden ser sintéticos o extraídos de diversas fuentes. El tamaño preferido de los péptidos puede ser entre 7 y 25 aminoácidos, en
30 dependencia del tipo de célula T que se desea estimular. No obstante la longitud puede variar entre 3 y 50 aminoácidos. Los péptidos utilizados pueden ser neutros o cargados. La naturaleza hidrofóbica de los péptidos también puede variar.

De igual forma la presente invención establece que las proteínas recombinantes utilizadas pueden ser expresadas en diversos sistemas de expresión como son bacterias, levaduras, plantas y células superiores. En una materialización preferida de esta invención se postula la utilización de la *N. meningitidis* como sistema de expresión, donde las proteínas de interés se expresan en la membrana externa de la propia bacteria. Esto posibilita que la proteína de interés, directamente forme parte del CPME. En este caso es igualmente válida la expresión de la proteína completa, o la inserción de alguno de sus polipéptidos o péptidos en uno o más de los lazos de las proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* como la TBP, Opa, Opc y las porinas P1, P2, P3.

En materializaciones particulares de la presente invención se muestra como los antígenos de las composiciones vacunales pueden ser receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa sobreexpresados en tejidos tumorales y, alternativamente, sus dominios extracelulares, con o sin región transmembrana, y que tienen una relación específica con gangliósidos expresados en la membrana de las células tumorales. Este es el caso de HER-1, HER-2 y el receptor del PDGF, entre otros.

Los receptores de factores de crecimiento que se refieren en la invención son proteínas obtenidas por vía recombinante a través de clonajes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) según los procedimientos regulares de Biología Molecular (Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T, *Molecular Cloning* A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) en plasmidios de expresión en células superiores. Los plasmidios conteniendo los genes que codifican para los receptores o sus variantes son transfectados establemente en células superiores como HEK 293 (ATCC CRL 1573), NIH-3T3 (ATCC CRL 1658) y CHO. Los receptores o sus variantes son expresados por las líneas transfectadas en sus membranas o son secretados al sobrenadante según sea el caso.

Estos antígenos son extraídos de la membrana de las células superiores que los expresan o del sobrenadante de cultivo de dichas células y purificados por cromatografía. Posteriormente son filtrados en condiciones estériles y liofilizados. Se conservan a 4°C. Las cantidades óptimas de éstos antígenos en las formulaciones vacunales oscilan entre 1 µg y 1000 µg por dosis.

Para este tipo particular de antígenos, el VSSP empleado en las formulaciones vacunales contienen gangliósidos seleccionados entre aquellos que se asocian de manera específica con los receptores de factores de crecimiento formando agrupaciones moleculares de membrana, siendo éste el caso de GM3 y GM1, entre
5 otros.

Los VSSP se encuentran presentes en esta composición vacunal en un rango entre 1 µg y 1000 µg referidos a cantidad de gangliósidos por dosis vacunal.

Las composiciones vacunales preferidas en esta invención, que son preparaciones vacunales que contienen como antígenos receptores de factores de crecimiento a
10 los cuales se les desea incrementar su inmunogenicidad, pueden prepararse de diversas maneras:

a). A los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no, región transmembrana) liofilizados (1-100 mg de proteína), se añaden cantidades de soluciones de VSSP, que permitan garantizar una relación
15 de masa receptor/gangliósido en un rango entre 0.1/1 a 1/1. Se procede a mezclar por agitación, entre 4°C y 20°C, durante un intervalo de tiempo entre 5 minutos y 24 horas. Esta preparación se conserva a una temperatura de 4°C hasta el momento de su administración al hospedero.

Justo antes de administrarse al hospedero, el preparado anteriormente descrito
20 se mezcla por agitación con AIF en relación volumen/volumen entre 40/60 y 60/40, durante un intervalo de tiempo entre 10 y 30 minutos, a temperatura ambiente. Las relaciones de volumen cubren el rango adecuado para el tipo de emulsión deseada según la vía de inoculación al hospedero.

b) Otra manera de proceder, igualmente conveniente, consiste en conservar por
25 separado recipientes conteniendo los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no región transmembrana) liofilizados y las soluciones de VSSP, a 4°C. Justo antes de administrarse al correspondiente hospedero, a los receptores de factores de crecimiento se les añaden cantidades de soluciones de VSSP, se procede a preparar la composición vacunal de la
30 misma manera descrita en el inciso a).

c) Una tercera manera de proceder consiste en combinar más de un receptor de factor de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no región transmembrana) con las correspondientes soluciones de VSSP en la

composición vacunal. Las cantidades de cada uno de los antígenos en la composición vacunal estarán en cualquier proporción que cubra el rango entre 1 μg y 1000 μg por dosis vacunal. Asimismo las cantidades de cada uno de los gangliósidos en forma de VSSP en la composición vacunal estarán entre 1 μg y 1000 μg por dosis vacunal.

Para preparar la vacuna combinada, los receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares (conteniendo o no región transmembrana) que formarán parte de ésta son liofilizados en las cantidades referidas en el inciso correspondiente. A continuación se les añaden cantidades de soluciones de VSSP que permitan garantizar una relación de masa receptores/gangliósidos en un rango entre 0.1/1 a 1/1. Se procede a mezclar por agitación, entre 4°C y 20°C, durante un intervalo de tiempo entre 5 minutos y 24 horas. Esta preparación se conserva a una temperatura de 4°C hasta el momento de su administración al hospedero.

Justo antes de administrarse al hospedero, el preparado anteriormente descrito se mezcla por agitación con AIF en relación volumen/volumen entre 40/60 y 60/40, durante un intervalo de tiempo entre 10 y 30 minutos a temperatura ambiente. Las relaciones de volumen cubren el rango adecuado para el tipo de emulsión deseada, según la vía de inoculación al hospedero.

d) Otra manera de preparar la vacuna combinada referida en el inciso c) es según se refiere en el inciso b).

Por otra parte, los sistemas multiantigénicos, como son células provenientes de líneas tumorales establecidas o aquellas obtenidas directamente de pacientes de cáncer, también se utilizan en las formulaciones descritas en la presente invención. La inactivación de las células se logra mediante el empleo de radiación gamma o por tratamiento con Mitomicina C. Otra alternativa igualmente conveniente es la utilización de oncolisados obtenidos por ruptura mecánica o infección con virus de las células tumorales.

Los preparados inmunopotenciadores de la presente invención pueden utilizarse ventajosamente en vacunas de ADN y ARN. También la inmunogenicidad de los vectores retro y adenovirales, usados como vehículos vacunales, se incrementa al combinarlos con las preparaciones descritas en la presente invención. Estos

vectores contienen los genes que codifican para las proteínas antigénicas de interés.

Normalmente las diferentes formulaciones inmunogénicas se obtienen al combinar los distintos sistemas de antígenos con VSSP previamente producido. Los
5 antígenos que se introducen directamente por vía recombinante en las membranas externas de la bacteria *N. meningitidis*, al igual que aquellos que se incorporan a los proteoliposomas durante el proceso de diálisis, salen ya incorporados del proceso de obtención de los VSSP. No obstante estos proteoliposomas modificados pueden utilizarse también con otros antígenos no incorporados. Esto permite la preparación
10 de vacunas multivalentes.

Los preparados con antígenos proteicos, se obtienen a partir de mezclar entre 10 y 1000 μg del péptido o proteína antigénica con cantidades de VSSP que permiten garantizar una relación de masa proteína total/gangliósido en un rango entre 1 y 3. Las preparaciones se conservan a una temperatura de 4°C hasta el momento de su
15 administración al hospedero. Otra manera de proceder, igualmente conveniente, consiste en conservar por separado las soluciones antigénicas y las soluciones de VSSP, a 4°C, y mezclarlos justo antes de administrarse.

Las formulaciones con ácidos nucleicos se obtienen mezclando directamente los VSSP con las soluciones de ADN o ARN. El proceso de mezclado se realiza a 4°C
20 garantizando una proporción de 2-100 μg de ácido nucleico por cada 0,1 mg de gangliósido en VSSP. Este método es factible debido a la ausencia de nucleasas en las preparaciones de VSSP.

En un proceder particularmente ventajoso mostrado en la presente invención, los vectores virales vivos (virus vaccinia, fowlpox u otros), que contienen las secuencias
25 de ADN de las proteínas de interés, son administrados al hospedero por vía endovenosa en cantidades que oscilan entre 10^6 y 5×10^7 pfu. Los VSSP se administran por vía intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral o intranasal, entre 12 horas antes y 12 horas después de administrar el vector viral.

Las preparaciones con células blanco de interés o sus lisados se obtienen primero
30 precipitando por centrifugación los respectivos cultivos y luego resuspendiendo el precipitado celular en cantidades de VSSP que permitan garantizar una relación entre 10^3 y 5×10^6 células por 0,1 mg de gangliósido. Estas cantidades se mezclan directamente por agitación, entre 4°C y 20°C, durante un intervalo de tiempo entre 5

y 24 horas. Las preparaciones se conservan a una temperatura de 4°C hasta el momento de administración al hospedero.

Otra manera de proceder, igualmente conveniente, consiste en conservar por separado las suspensiones celulares o sus correspondientes lisados y las soluciones de VSSP, a 4°C, y mezclarlos justo antes de administrarse.

Las preparaciones descritas en la presente invención, en las que los antígenos están mezclados o incorporados a los VSSP, pueden administrarse solas o emulsificadas con adyuvante incompleto de Freund (AIF). Las emulsiones se preparan justo antes de administrarse al hospedero. Cada preparación se mezcla por agitación con el adyuvante en relación volumen/volumen entre 40/60 y 60/40, durante un intervalo de tiempo entre 10 y 30 minutos, a temperatura ambiente. Las relaciones de volumen cubren el rango adecuado para el tipo de emulsión deseada según la vía de inoculación al hospedero.

En otra materialización preferida de la presente invención las preparaciones descritas, en las que los antígenos están mezclados o incorporados a los VSSP, se liofilizan antes de administrarse solas o emulsificadas con adyuvante incompleto de Freund.

Las composiciones vacunales de la presente invención se pueden introducir en el paciente por vía parenteral (intramuscular, intradérmica, subcutánea) o por aplicación directa sobre mucosas.

Ejemplos de Realización.

Ejemplo 1. Obtención de un antígeno de la composición vacunal compuesto por Dominio extracelular (ECD, siglas en inglés) del EGF-R murino (ECD-EGF-Rm).

El gen que codifica para el ECD-EGF-Rm fue amplificado empleando la técnica de PCR, a partir de ADN complementario (ADNc) de hígado de ratón. El PCR se realizó mezclando 1 µg de DNAc con, 10 pmoles de cada cebador específico. Posteriormente se adicionó 0.2 mMolar de cada dNTP y 1 U de Taq polimeriza. Se realizaron 30 ciclos de PCR con temperaturas de 9°C, 1 min. (excepto en el primer ciclo que fueron 3 min.); 56°C, 1 min.; 72°C, 1 min. y 30 seg. (excepto en el último ciclo que fueron 5 min.). El gen amplificado fue clonado en el vector de expresión en células superiores pcDNA3 (Amp^r, f'ori, ColE ori, CMV-Promotor, SV40 ori, SV40pa, Neomycin, Invitrogen), y posteriormente las células de la línea HEK-293 fueron

transfectadas establemente con este plasmidio. Se llevó a cabo la transfección por los métodos convencionales y las células fueron crecidas en un medio selectivo. El ECD-EGF-Rm se obtiene a partir del sobrenadante de la línea HEK-293/ECD-EGF-Rm que expresa establemente el ECD-EGF-Rm.

- 5 El ECD-EGF-Rm obtenido en el sobrenadante de cultivo es purificado por técnicas de cromatografía de afinidad, acoplando el ligando a la matriz (*Affinity Chromatography* principles and methods 3:12, Pharmacia fine Chemicals); posteriormente es filtrado en condiciones estériles, y liofilizado.

Ejemplo 2. Obtención de una composición vacunal que comprende el ECD-EGF-Rm, VSSP-GM3 y adyuvante incompleto de Freund (AIF), combinando
10 **todos los componentes justo antes de la administración.**

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 incorporado fueron obtenidos según se refiere en la patente No. US 6,149,921.

- 15 Para ello, el complejo OMPC de *N. meningitidis* suministrado por el Instituto "Carlos J. Finlay" (C. Campa et al EP 301992) fue empleado. 10 mg de este complejo OMPC se dispersan en una solución de 0.5 % deoxicolato de sodio y 0.1 % dodecil sulfato sodio conteniendo además 10 mg de NAcGM3, mediante mezcla suave durante la noche a 4°C.

- 20 La separación del complejo soluble OMPC-NGCGM3 de los detergentes se llevó a cabo mediante diálisis, durante 14 días, empleando una membrana de 3.5 Kda.

El dializado fue ultracentrifugado a 100 000 g durante 1 h y el inmunógeno presente en el sobrenadante fue esterilizado por filtración.

- 25 El grado de incorporación del gangliósido a la proteína fue determinado usando el reactivo Bio-Rad para las proteínas y resorcinol para el ácido siálico. De esta forma se obtiene una incorporación de 1 mg de NGcGM3 por mg de OMPC.

La cantidad empleada del vehículo vacunal anteriormente preparado es de 120 µg, referido a cantidad de gangliósidos incorporado en los proteoliposomas por dosis vacunal.

- 30 Para preparar el inmunógeno, 1 mg de ECD-EGF-Rm fue liofilizado y conservado a 4°C hasta el momento de la inmunización. Justo antes de la administración a los ratones, se añadieron al antígeno 2.4 mg de VSSP-GM3 (referidos a cantidad de gangliósido) en un volumen de 1 mL y se mezclaron ambos componentes a

temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de AIF y se realizó la mezcla por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 3. Obtención de una composición vacunal que comprende el ECD-EGF-Rm, VSSP-GM3 y AIF combinando parte de los componentes y conservando la mezcla hasta el momento de la administración.

Las proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 fueron obtenidas según se refiere en la patente No. US 6,149,921. La cantidad de vehículo vacunal empleado fue de 120 µg referido a cantidad de gangliósidos por dosis vacunal.

Para preparar el inmunógeno, 1 mg del ECD-EGF-Rm fue liofilizado, y a continuación se le añadieron 2.4 mg de VSSP-GM3 (referidos a cantidad de gangliósido incorporado), en un volumen de 1 mL. Se mezclaron ambos componentes a temperatura ambiente durante 15 minutos y fueron conservados a 4 °C hasta el momento de la inmunización. Justo antes de la administración a los ratones se añadió 1 mL de AIF y se realizó la mezcla por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 4. Obtención de una vacuna combinada comprendiendo el ECD-HER-1, el ECD-HER-2, VSSP-GM3 y AIF.

Las proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 fueron obtenidos según se refiere en la patente No. US 6,149,921. La cantidad de vehículo vacunal empleado fue de 120 µg referido a cantidad de gangliósidos incorporado en los proteoliposomas por dosis vacunal.

Para preparar el inmunógeno, 1 mg del ECD-HER-1 y 1 mg del ECD-HER-2 fueron liofilizados juntos, y conservados a 4°C hasta el momento de la inmunización. Justo antes de la administración a los ratones, se añadieron 2.4 mg de VSSP-GM3 (referidos a cantidad de gangliósido) en un volumen de 1 mL. Se mezclaron todos los componentes a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de AIF y se realizó la mezcla por agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Ejemplo 5. Inducción de respuesta inmune específica al R-EGF autólogo por la composición vacunal.

- Ratones de la línea C57BL/6 se inmunizaron con la composición vacunal que contiene el ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3 y AIF, preparada según se refiere en el ejemplo 2. La dosis de inmunógeno fue de 50 μ g por ratón referido a cantidad de antígeno en la composición. El esquema de inmunización seguido comprendió tres
- 5 dosis por vía intramuscular cada quince días, con extracciones de sangre los días 0, 21, 35 y 56 después de la primera inmunización (Grupo II). Como referencia se tomó un grupo de ratones de la misma línea inmunizados con 50 μ g del ECD-EGF-Rm conjugado químicamente a KLH y adyuvado en Adyuvante Completo de Freund (ACF) y AIF, siguiendo el mismo esquema de inmunización (Grupo I). Los sueros
- 10 obtenidos fueron ensayados por ELISA para su reconocimiento al ECD-EGF-Rm. El ELISA se realizó recubriendo la placa con 10 μ g/mL de ECD-EGF-Rm. Después de bloquearse la placa con PBS/suero de ternera 5%, fueron incubados los sueros de los animales inmunizados y controles a diferentes diluciones. A continuación se añadió un conjugado de anticuerpos anti-IgG de ratón (específico para el Fc) con
- 15 fosfatasa alcalina (Sigma). Todas las incubaciones antes mencionadas se realizaron durante 1 hora a 37°C y después de cada uno de los pasos mencionados se realizaron tres lavados con PBS/Tween 20 0.05%. La reacción se reveló con la adición de 1 mg/mL de sustrato (p-nitrofenilfosfato) en tampón dietanolamina, pH 9.8. La absorbancia a 405 nm fue medida en un lector de ELISA a los 30 min.
- 20 El 100% de los ratones inmunizados con la composición vacunal de la invención desarrolló una respuesta de anticuerpos específicos contra el ECD-EGF-Rm, que aumentó durante el curso de las inmunizaciones, llegando a alcanzar títulos de hasta 1/160000, mientras que los sueros preinmunes no reconocieron al ECD-EGF-Rm. El isotipo de la respuesta de anticuerpos desarrollada fue fundamentalmente de
- 25 tipo IgG.
- La distribución de subclases de la respuesta de anticuerpos inducida fue determinada por ELISA. El 20.21% de los anticuerpos fue IgG2a, un 36.03% IgG1 y un 38.93% fue IgG2b, apreciándose un corrimiento hacia el patrón de respuesta Th1 respecto al grupo de referencia (Figura 1).
- 30 A pesar de que la presente composición vacunal se compara con una composición en la que el ECD-EGF-Rm está acoplado químicamente a KLH, y en donde se emplea como adyuvante el ACF, los títulos de anticuerpos inducidos por la

preparación son superiores, y la distribución de subclases tiende más a un patrón Th1, resultando favorable para la eficacia de dicha vacuna.

Los ratones inmunizados con ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/AIF no presentaron signos de toxicidad clínica, y las pruebas bioquímicas realizadas a los sueros de dichos animales no mostraron diferencias con las realizadas a los sueros de animales no inmunizados (Tabla 1).

Tabla 1

Grupos	Animales respondedores	Títulos de IgG						
		1/100	1/500	1/1000	1/2500	1/5000	1/10000	1/20000
	Día 21							
I	8/10	1	3	1		1	1	1
II	10/10		1	1	2	5	1	
	Día 35							
I	10/10		2		2	1		5
II	10/10		1			2	1	6
	Día 56							
I	10/10	1	1	1	2	1	4	
II	10/10		1		1	2	4	2

Grupo I – Animales inmunizados con ECD-EGF-Rm/KLH/ACF y AIF

Grupo II – Animales inmunizados con ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/Montanide-ISA 51

10 **Ejemplo 6. Reconocimiento de los sueros de ratones inmunizados con el DEC-HER-1/VSSP-GM3/AIF a células que expresan el EGF-R humano.**

Células de la línea A431 (10000 células / pozo) que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano fueron incubadas con suero preinmune de ratones C57BL/6 diluidos 1/5 (A), anticuerpo monoclonal ior egf-r3 contra el EGF-R como control positivo a una concentración de 10 µg/mL (B) y suero de ratones C57BL/6 inmunizados diluidos 1/5 (C), durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpos no unido al receptor o unido de forma inespecífica fue removido realizando lavados con solución de fosfato tamponada/suero de ternera 0.5%. Para la inmunodetección las células fueron incubadas con un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína diluido 1/50, 30 minutos a temperatura ambiente. La intensidad de la fluorescencia fue medida en un citómetro de flujo (FACS). El suero de los ratones inmunizados con el preparado vacunal reconocieron las células que expresan el EGF-R, con intensidades

comparables a las del control positivo del experimento, a diferencia de los sueros preinmunes de los mismos animales (Figura 2).

Ejemplo 7. Actividad citolítica de los sueros de ratones inmunizados con DEC-HER-1/VSSP-GM3/AIF

5 Células de la línea A431 (3×10^6 células) fueron incubadas con cromato de sodio radioactivo ^{51}Cr durante 1h, y el exceso de sales radiactivas fue eliminado mediante tres lavados con medio de cultivo. Las células cargadas con ^{51}Cr fueron incubadas con:

- i) 50 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo monoclonal ior-t3 (AcM contra el CD3, como control
- 10 negativo)
- ii) 50 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo monoclonal ior egf-r3 (AcM contra el EGF-R como control positivo)
- iii) suero preinmune de ratones C57BL/6 diluidos 1/20
- iv) suero de ratones C57BL/6 inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3/AIF diluidos
- 15 1/20

Después de 1 hora de incubación a 37°C , se añadieron 40 μL de complemento de conejo dejándose en incubación a 37°C . Posteriormente se centrifugaron los tubos y 100 μL del sobrenadante se utilizaron para medir en un contador gamma de radiactividad la liberación de ^{51}Cr , como una medida de la lisis celular ocurrida

20 mediada por los anticuerpos y el complemento. La incorporación total se midió mediante lisis total con detergente.

Los sueros de los ratones inmunizados con el preparado vacunal referido lisaron el 80 % de las células A431 que expresan el EGF-R, a diferencia de los sueros preinmunes de dichos ratones que solo alcanzaron a lisar un 35 % (Figura 3).

25 **Ejemplo 8. Capacidad neutralizante de los sueros de ratones inmunizados con DEC-HER-1/VSSP-GM3/AIF.**

Los sueros de ratones inmunizados con el preparado vacunal referido en la patente fueron ensayados para su capacidad de inhibir la unión del EGF a su receptor en la membrana de las células A431. Para ello, las células A431 fueron crecidas en

30 placas de cultivo hasta la confluencia. Una vez confluentes, fue añadido un pool de suero inmune a diferentes diluciones (1/5, 1/10, 1/20, 1/40) y a continuación se añadió EGF- ^{125}I a razón de 100000 cpm/pozo. El volumen de cada pozo fue completado hasta 500 μL de PBS/BSA 1% en cada pozo. Las placas se incubaron a

temperatura ambiente durante 1 hora y pasado este tiempo la reacción fue detenida añadiendo 2 mL de PBS/BSA 1% frío. Posteriormente se desechó el líquido de cada uno de los pozos, y después de un lavado suave con PBS/BSA 1%, se añadieron a los pozos 300 μ L de NaOH 2M. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se recogieron 200 μ L de cada uno de los pozos, y se leyeron en un contador de radiaciones gamma.

El pool de sueros inmunes mostró una inhibición de la unión del EGF-¹²⁵I a su receptor en la membrana de las células A 431. Esta inhibición fue dependiente de la dilución del suero (Figura 4).

10 **Ejemplo 9. Sobrevida de los ratones inmunizados con DEC-HER-1/VSSP-GM3/AIF.**

Ratones de la línea C57/BL6, inmunizados con ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/AIF (tres dosis de 50 μ g cada quince días por vía intramuscular), se trasplantaron con 100000 células de Lewis por vía intramuscular y fueron observados para determinar el tiempo de sobrevida. Las células de Lewis son derivadas de un adenocarcinoma de pulmón de origen murino que expresan el EGF-R. La sobrevida de estos ratones se comparó con la de un grupo inmunizado con ECD-EGF-Rm/ACF (tres dosis de 50 μ g cada quince días por vía subcutánea). Los ratones inmunizados con el preparado vacunal ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/AIF tuvieron una sobrevida significativamente superior ($p < 0.05$) que los ratones del grupo de referencia (Figura 5).

Ejemplo 10. Obtención de una composición vacunal que contiene al anticuerpo monoclonal quimérico P3 (AcMq P3), VSSP(GM3) y AIF.

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 [VSSP(GM3)], fueron obtenidos según se refiere en la patente cubana 130/97 y en la patente USA 6,149,921. Los VSSP(GM3) se conservaron a concentración de 4,8 mg/mL en solución Tris/HCl pH 8.9 y a una temperatura de 4° C, hasta su utilización.

Para preparar el inmunógeno, se mezcló una solución conteniendo 2 mg/mL del AcM quimérico P3 (Patente No. US 5,817,513) en solución tampón de fosfato salina con el preparado VSSP(GM3) en una proporción 1/1 (v/v). El proceso de mezclado se realizó por agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se añadió el AIF en una proporción 1/1 (v/v). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, hasta lograr la emulsión.

En otra forma de proceder igualmente conveniente se mezcló una solución conteniendo 2 mg/mL del AcMq P3 en solución tampón de fosfato salina con el preparado VSSP(GM3) en una proporción 1/1 (v/v). El proceso de mezclado se realizó por agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 min. y la solución resultante se esterilizó por filtración a través de membranas de acetato de celulosa de 0,2 μ m. Después de un proceso de dosificación, envasado y sellado el preparado se conservó a 4°C por un período de hasta un año. Justo antes de la administración al hospedero se añadió la preparación al AIF en una proporción 1/1 (v/v) y se realizó la emulsificación por agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Ejemplo 11. Obtención de una composición vacunal que contiene un péptido de la región variable de la cadena pesada del AcMq P3 (CDR3/VH-P3) y VSSP(GM3).

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 [VSSP(GM3)], fueron obtenidos según se refiere en la patente cubana 130/97 y en la patente USA 6,149,921. Los VSSP(GM3) se conservaron a concentración de 4,8 mg/mL en solución Tris/HCl pH 8.9 y a una temperatura de 4° C, hasta su utilización.

En el momento de aplicarlo al hospedero, el inmunógeno se preparó primeramente disolviendo péptido del CDR3 VH-P3 liofilizado en solución tampón de fosfato salina hasta lograr una concentración de 4 mg/mL. Posteriormente se mezcló con el preparado VSSP(GM3) en una proporción 1/1 (v/v). El proceso de mezclado se realizó por agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 min.

En otra forma de proceder igualmente conveniente primeramente se disolvió péptido del CDR3 VH-P3 liofilizado en solución tampón de fosfato salina hasta lograr una concentración de 4 mg/mL. Posteriormente se mezcló con el preparado VSSP(GM3) en una proporción 1/1 (v/v). El proceso de mezclado se realizó por agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 min. y la solución resultante se esterilizó por filtración a través de membranas de acetato de celulosa de 0,2 μ m. Después de un proceso de dosificación, envasado y sellado el preparado se conservó a 4°C por un período de hasta un año.

Ejemplo 12. Obtención de una composición vacunal que contiene un oncolisado de melanoma B16, VSSP(GM3) y AIF.

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 [VSSP(GM3)], fueron obtenidos según se refiere en la patente cubana 130/97 y en la patente USA 6,149,921. Los VSSP(GM3) se conservaron a concentración de 2,4 mg/mL en solución Tris/HCl pH 8.9 y a una temperatura de 4° C, hasta su utilización.

Para preparar el inmunógeno, una suspensión de células de la línea de melanoma murino B16 (50×10^6 células/mL) se sometió a 5 ciclos de congelación / descongelación, alternando incubaciones en baños de nitrógeno líquido y en baños de H₂O destilada a 37°C. El lisado celular resultante se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en VSSP(GM3) garantizando una proporción de pellet celular correspondiente a 10×10^6 células por cada 2,4 mg de GM3 en VSSP. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió la preparación al AIF en una proporción 1/1 (v/v). La mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente durante 15 minutos, hasta lograr la emulsión.

Ejemplo 13. Obtención de una composición vacunal que contiene células de melanoma B16, VSSP(GM3) y AIF.

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 [VSSP(GM3)], fueron obtenidos según se refiere en la patente cubana 130/97 y en la patente USA 6,149,921. Los VSSP(GM3) se conservaron a concentración de 2,4 mg/mL en solución Tris/HCl pH 8.9 y a una temperatura de 4° C, hasta su utilización.

Para preparar el inmunógeno, una suspensión de células de la línea de melanoma murino B16 (50×10^6 células/mL) se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. El pellet de células se resuspendió con el VSSP(GM3) garantizando una proporción de 10×10^6 células por cada 2,4 mg de GM3 en VSSP. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió la preparación al AIF en una proporción 1/1 (v/v). La mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente durante 15 minutos, hasta lograr la emulsión.

Ejemplo 14. Obtención de una composición vacunal que contiene un plásmido con el gen que codifica para el dominio extracelular del receptor de EGF humano (ECD-HER1), VSSP(GM3) y AIF.

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 [VSSP(GM3)], fueron obtenidos según se refiere en la patente cubana 130/97 y en la patente USA 6,149,921. Los VSSP(GM3) se conservaron a concentración de 4,8 mg/mL en solución Tris/HCl pH 8.9 y a una temperatura de 4° C, hasta su utilización.

El vector para insertar el ADN de interés fue el plasmidio de expresión en mamíferos pcDNA3, que contiene el origen de replicación de SV40 y el promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano (pCMVIT). En este plasmidio se insertó el gen que codifica para el dominio extracelular del receptor de EGF humano (ECD-HER1). El plasmidio resultante (ECD-HER1/pcDNA3) fue utilizado en la preparación del inmunógeno.

Para preparar el inmunógeno, la solución del plasmidio ECD-HER1/pcDNA3 se ajustó a una concentración de 2 mg/mL en solución tampón de fosfato salina. Posteriormente se mezcló con el preparado VSSP(GM3) en una proporción 1/1 (v/v). La mezcla se realizó por agitación a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente la preparación se añadió al AIF en una proporción 1/1 (v/v). La mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente durante 15 minutos, hasta lograr la emulsión.

Ejemplo 15. Inducción *in vitro* de maduración de células dendríticas por el preparado VSSP(GM3).

Las células dendríticas humanas se obtuvieron a partir de monocitos aislados de sangre periférica que fueron cultivados, durante 7 días, en presencia de GM-CSF humano recombinante (hr) (50 ng/ml) y hr-IL4 (1000 U/ml). Al 7mo día las células dendríticas obtenidas fueron expuestas o no, durante 18 horas, a los VSSP(GM3) (1 µg/mL). Como referencias las células dendríticas se incubaron con 0,1 µg/mL de LPS purificado a partir de la cepa 44/76 de *Neisseria meningitidis* o con MPLA (Sigma). El fenotipo de cada preparación se analizó por citometría de flujo.

Como se muestra en la Tabla 2, el tratamiento con VSSP(GM3) provocó un aumento en la expresión de CD11c y cambios considerables en el marcador de maduración de las DC CD83. Se observó un aumento en los niveles de expresión de la molécula HLA-DR. Los VSSP(GM3) indujeron un incremento en el número de células que expresan la molécula CD86. VSSP(GM3) y LPS mostraron igual capacidad de

inducir maduración en las DC tratadas. En cambio la variante detoxificada del LPS, MPLA se mostró inferior.

Tabla 2. Efecto de distintos preparados sobre la maduración de DC humanas.

	CD11c	CD86	CD83	HLA-DR	CD40
Medio	37,5	12,5	5,5	401,5	9
LPS	57,1	35,4	14,6	672,7	15,8
VSSP	60	29,6	13,3	656,4	14,1
MPLA	40,1	15,4	5,6	415,5	9,7

5

Datos: medias de intensidad de fluorescencia de las mediciones de FACS

Ejemplo 16. Inducción de respuesta inmune humoral específica al AcMq P3 asociada a la administración de la composición vacunal.

Ratones de la línea C57BL/6 se inmunizaron con la composición vacunal referida en el Ejemplo 10. Se inocularon 50 µg del monoclonal quimérico en cada inyección, aplicándose 2 dosis (una cada 14 días) por vía intramuscular. 21 días después de la primera inmunización se tomaron muestras de suero. Como referencia se usó un grupo de ratones de la misma cepa inmunizados del mismo modo con el AcMq P3 adyuvado en AIF o Alúmina. Los sueros obtenidos fueron ensayados por ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-AcMq P3.

El 100% de los ratones inmunizados con la composición vacunal descrita en la presente invención desarrollaron niveles de anticuerpos IgG específicos contra el AcMq P3, superiores a los de los grupos de referencia. (Tabla 3).

Tabla 3. Respuesta de anticuerpos inducida contra el AcMq P3 en ratones C57BL/6 inmunizados con distintas formulaciones

Formulación	# de animales respondedores	Títulos de IgG específicas(media)
AcMP3q/VSSP/AIF	5/5	8000
AcMP3q/AIF	4/5	4000
AcMP3q/Alúmina	2/5	1000

Ejemplo 17. Inducción de respuesta celular proliferativa específica al péptido CDR3/VH-P3 asociada a la administración de la composición vacunal.

Ratones de la línea C57BL/6 se inmunizaron con la composición vacunal descrita en el Ejemplo 11. Se inocularon 100 µg del péptido en cada inyección, aplicándose 4 dosis (una cada 14 días) por vía intramuscular. Como referencia se usó un grupo de ratones de la misma cepa inmunizados del mismo modo con el péptido CDR3/VH-P3 adyuvado en AIF o Alúmina. 7 días después de la última dosis se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales de los animales y se aislaron los linfocitos por perfusión del órgano. Los linfocitos se cultivaron por 96 horas con el péptido CDR3/VH-P3 (50 µg/mL). Durante las últimas 18 horas de cultivo, las células recibieron 1 µCi de timidina tritiada (Amersham, Reino Unido) y posteriormente fueron cosechadas y las emisiones β (cpm) detectadas en un contador de centelleo (LKB Wallac, Finlandia). Los niveles de proliferación celular se analizaron como Índice de Estimulación (IE). Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Respuesta linfoproliferativa inducida contra el péptido CDR3/VH-P3 en ratones C57BL/6 inmunizados con distintas formulaciones

	CDR3/VH-P3/VSSP(GM3)	CDR3/VH-P3/AIF	CDR3/VH-P3/Alúmina
50 µg/mL	4 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2

Datos: Valores de índice de estimulación

Notoriamente solo el péptido contenido en la formulación con VSSP(GM3) fue capaz de inducir proliferación antígeno específica.

Ejemplo 18. Inducción de respuesta celular citotóxica específica al ECD-mEGFR asociada a la administración de la composición vacunal que contiene FPV recombinante ECD-mEGFR/FPV, VSSP(GM3) y AIF.

Los proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* incluyendo el gangliósido GM3 [VSSP(GM3)], fueron obtenidos según se refiere en la patente cubana 130/97 y en la patente USA 6,149,921. Los VSSP(GM3) se conservaron a concentración de 2,4 mg/mL en solución Tris/HCl pH 8.9 y a una temperatura de 4° C, hasta su utilización.

El vector viral para insertar el ADN de interés fue el Virus de Viruela Aviar (FPV). El gen que codifica para el dominio extracelular del receptor de EGF murino (ECD-mEGFR) fue insertado en el FPV por recombinación homóloga. La solución del vector recombinante ECD-mEGFR/FPV se ajustó a una concentración de 10⁸ pfu/mL.

En paralelo se preparó la emulsión de VSSP(GM3)añadiendo la solución del vehículo al AIF en una proporción 1/1 (v/v). La mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente durante 15 minutos.

Seguidamente se procedió a inmunizar ratones Balb/c con 200 μ L de la solución de ECD-mEGFR/FPV por vía intraperitoneal y con 100 μ L de VSSP(GM3)/AIF por vía intramuscular, consecutivamente. Como control fue utilizado un grupo de ratones a los que se les administró el ECD-mEGFR/FPV y solución tampón con fosfato salina (STFS). Se administraron 2 dosis bisemanales y 21 días después de iniciado el experimento los ratones se sacrificaron para obtener las correspondientes células esplénicas. De los esplenocitos se aislaron las células T CD8⁺ utilizando la tecnología de las perlas magnéticas. Estas células T se estimularon durante 5 días con células dendríticas derivadas de médula ósea (bmDC), previamente pulsadas con el péptido inmunodominante del ECD-mEGFR 'NYGTNRTGL' , en una proporción 10:1 (T:bmDC) y en presencia de IL-2 (50 u/mL). Al finalizar la estimulación se realizó un experimento de citotoxicidad donde se determinó la liberación de Cr⁵¹ al enfrentar diferentes cantidades de estas células a la línea P815 pulsada con el péptido 'NYGTNRTGL' (Tabla 5).

Tabla 5. Respuesta celular citotóxica específica al ECD-mEGFR

	Grupo inmunizado con ECD-mEGFR/FPV + VSSP(GM3)		Grupo inmunizado con ECD-mEGFR/FPV + STFS	
	P815+pept	P815	P815+pept	P815
% de liberación de Cr ⁵¹				
100:1	78	8	43	9
50:1	51	6	25	7
25:1	29	5	14	5

La administración de VSSP(GM3) en los animales potenció al doble la capacidad de inducción de células T citotóxicas que tiene el FPV.

Ejemplo 19: Propiedades Inmunorestauradoras del vehículo vacunal VSSP.

El vehículo vacunal VSSP, descrito en esta invención, se administró por vía intramuscular (i. m.) a pacientes de melanoma metastásico en el marco de un Ensayo Clínico de Fase I. Los pacientes recibieron 9 dosis (200 μ g de NGcGM3 en

VSSP) en el lapso de 6 meses. Las 5 primeras dosis se administraron en los primeros 2 meses y las 4 restantes se dieron mensualmente.

Se extrajo sangre de los pacientes el día 0 (antes de administrar la primera dosis) y el día 56 (quinta dosis). Paralelamente se tomó sangre de 8 voluntarios sanos. De estas muestras se obtuvieron las correspondientes células mononucleares periféricas (CMP) por el método de gradiente de Ficoll y se determinaron por citometría de flujo los % de células CD3+, CD4+ y CD8+. Como se muestra en la Tabla 6, la expresión relativa de los marcadores de células T CD3, CD4 y CD8, provenientes de las CMP de los 3 pacientes tomados para ejemplificar, es inferior a la media de la expresión de los donantes sanos en el día 0.

Tabla 6. Expresión relativa de los marcadores de células T provenientes de las CMP de pacientes de melanoma y controles sanos. Efecto de VSSP(NGcGM3) en la normalización de los marcadores.

	% del total de CMP Día 0			% del total de CMP Día 56		
	CD3+	CD4+	CD8+	CD3+	CD4+	CD8+
Controles sanos	70	45	25	-	-	-
EM	30	25	5	70	48	22
SJ	26	40	4	70	40	18
VD	15	28	4	70	56	20

Notoriamente los niveles relativos de expresión de marcadores de células T CD3, CD4 y CD8 en las CMP de los mismos pacientes se normalizaron para el día 56 o sea después de haber recibido 4 inyecciones de VSSP(NGcGM3).

Breve descripción de las figuras:

Figura 1. Distribución de subclases de los anticuerpos inducidos a partir de la inmunización con ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/AIF.

Sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con ECD-EGF-Rm/KLH/ACF (I) o ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/AIF (II) fueron ensayados por ELISA para la determinación de la distribución de subclases de IgG inducida por la inmunización.

Figura 2. Reconocimiento de los sueros de ratones inmunizados con el DEC-HER-1/VSSP-GM3/AIF a células que expresan el EGF-R.

Células de la línea A431, fueron incubadas con suero preinmune de ratones C57BL/6 (A), anticuerpo monoclonal ior egf-r3 como control positivo (B) y suero de ratones C57BL/6 inmunizados (C). Para la inmunodetección, un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a un fluoróforo fue utilizado. La intensidad de la fluorescencia fue medida en un citómetro de flujo.

Figura 3. Actividad citolítica de los sueros de ratones inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3/AIF.

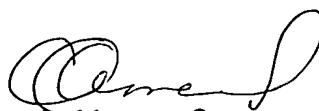
Células A431 cargadas con ^{51}Cr fueron incubadas con complemento y: I) Anticuerpo monoclonal ior-t3 (contra el CD3, como control negativo), II) Anticuerpo monoclonal iorEGF-R-r3 (contra el EGF-R, como control positivo), III) suero preinmune de ratones C57BL/6, IV) suero de ratones C57BL/6 inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3/AIF V) Igual número de células que en los puntos anteriores fueron lisadas con detergentes como medida de la incorporación total de ^{51}Cr . Los resultados son presentados en % de lisis específicas.

Figura 4. Capacidad neutralizante de los sueros de ratones inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3/AIF.

Células A 431 fueron incubadas con diluciones 1/5, 1/10, 1/20 y 1/40 de un pool de sueros de ratones inmunizados con ECD-HER-1/VSSP-GM3/AIF o con las mismas diluciones de un pool de sueros preinmunes. EGF- ^{125}I (100000 com) fue añadido en cada pozo y la unión total fue medida incubando las células con el EGF125I. Las CPM fueron medidas en un contador de radiaciones gamma.

Figura 5. Sobrevida de los ratones inmunizados con el ECD-EGF-Rm/VSSP-GM3/AIF trasplantados con Tumor de Lewis.

Ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados según se refiere en el ejemplo 9, fueron trasplantados con 100000 células de Tumor de Lewis y observados para medir sobrevida. Como grupo de referencia fueron trasplantados ratones de la misma cepa inmunizados con ECD-EGF-Rm/ACF.


Olga L. Moreno Samper,
Agente Oficial.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para potenciar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos, que contiene:
 - 5 (A) uno o más antígenos poco inmunogénicos;
 - (B) un vehículo vacunal que consiste en proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de una bacteria Gram-negativa (*Neisseria meningitidis*) los cuales contienen gangliósidos incorporados; y
 - (C) eventualmente uno o más adyuvantes.
- 10 2. Una composición farmacéutica para potenciar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos, según la reivindicación 1 donde los antígenos poco inmunogénicos pueden ser péptidos, o polipéptidos, o proteínas, o sus correspondientes secuencias de ácidos nucleicos, o células blanco de interés vacunal, o sus lisados, o la mezcla de ellos.
3. Una composición según la reivindicación 2 donde los antígenos poco inmunogénicos
- 15 son receptores de factores de crecimiento o sus dominios extracelulares.
4. Una composición según la reivindicación 3 donde los dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento pueden contener o no la región transmembrana.
5. Una composición según la reivindicaciones 3 y 4 donde los receptores de factores de crecimiento son el HER-1, HER-2, R-PDGF o cualquiera de sus variantes que contenga
- 20 el dominio extracelular con y sin región transmembrana.
6. Una composición según reivindicación 1 donde los proteoliposomas del vehículo vacunal se obtienen del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, tanto proveniente de una cepa salvaje o de una modificada genéticamente.
7. Una composición según la reivindicación 1 donde los proteoliposomas del vehículo
- 25 vacunal con gangliósidos incorporados se obtienen mediante la incorporación hidrofóbica de dichos gangliósidos al complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.
8. Una composición según reivindicación 7 donde los gangliósidos que se incorporan hidrofóticamente al complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria*
- 30 *meningitidis* son GM1, GM3 o sus variantes N-glicosiladas.
9. Una composición según reivindicación 1 donde el adyuvante es de naturaleza oleosa o es un polipéptido natural o recombinante.

10. Una composición según reivindicación 9 donde el adyuvante de naturaleza oleosa es el Adyuvante Incompleto de Freund.
11. Una composición según la reivindicación 10, donde el Adyuvante Incompleto de Freund empleado es Montanide ISA 51.
- 5 12. Una composición según reivindicación 9 donde el adyuvante polipeptídico es una citocina o una quimiocina.
13. Una composición según reivindicación 12 donde la citocina es el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos.
14. Una composición según reivindicaciones de la 1 a la 13 para la prevención y tratamiento
10 del cáncer, particularmente cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, cerebro, gliomas, así como de enfermedades crónicas no transmisibles.
15. Una composición según las reivindicaciones de la 1 a la 13 para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas de origen viral y bacteriano.
- 15 16. Una composición según la reivindicación 14 para el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
17. Una composición según las reivindicaciones de la 1 a la 13 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.
18. Uso de la composición de las reivindicaciones de la 1 a la 17 para la prevención y
20 tratamiento del cáncer, particularmente cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario, cabeza-cuello, vulva, vejiga, cerebro, gliomas, así como de enfermedades crónicas no transmisibles.
19. Uso de la composición de las reivindicaciones de la 1 a la 17 para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas de origen viral y bacteriano.
- 25 20. Uso de la composición de las reivindicaciones de la 1 a la 17 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.


Olga L. Moreno Sampedro,
Agente Oficial.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con la Inmunología y más específicamente con composiciones inmunogénicas que contienen péptidos, polipéptidos, proteínas,
5 sus correspondientes secuencias de ADN, células o sus lisados y proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP), formados estos últimos al unir el complejo de proteínas de la membrana externa (CPME) de *Neisseria meningitidis* con gangliósidos, mediante enlaces hidrófobos.

En particular esta invención muestra como preparar composiciones
10 immunoestimuladoras capaces de generar respuestas inmunes antígeno-específicas inclusive en huéspedes inmunocomprometidos, como son los que padecen de cáncer e infecciones de origen viral o bacterianas crónicas. En estos pacientes, la administración de las composiciones vacunales descritas permite restaurar la funcionalidad de sectores de su sistema inmunitario.

15 Las composiciones vacunales de esta invención pueden ser utilizadas para proteger de o tratar enfermedades infecciosas, malignas o autoinmunes.

20 
Olga E. Moreno Samper,
Agente Oficial.

Figura 1

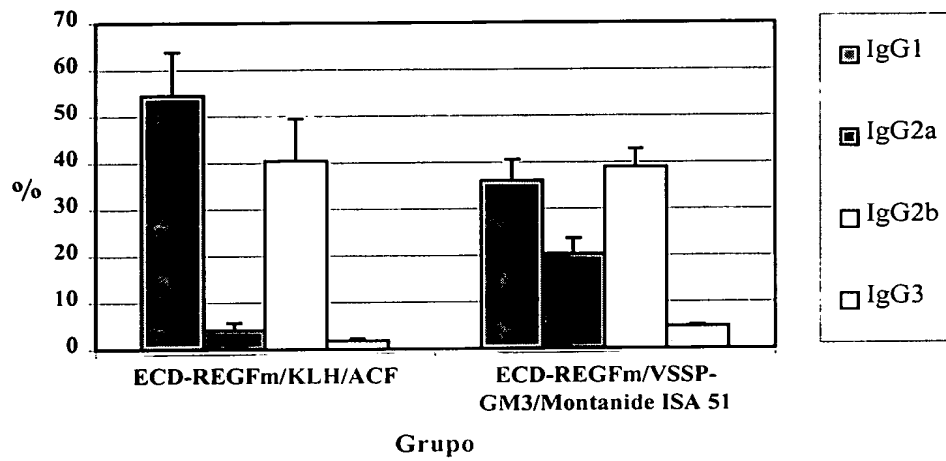
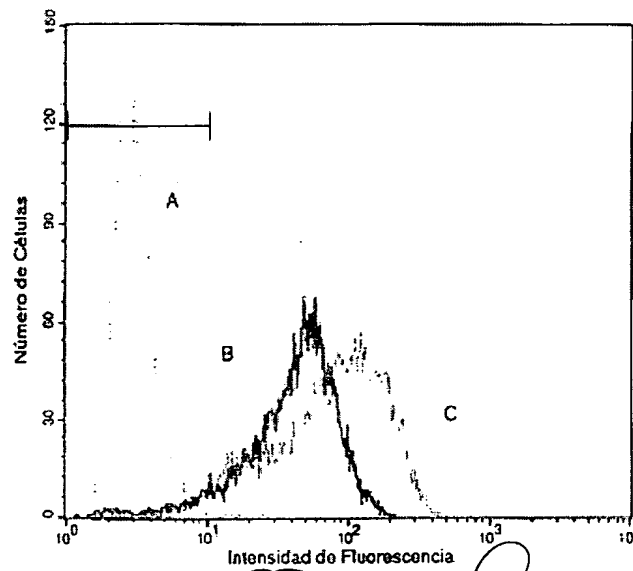


Figura 2



Olga L. Moreno Samper
Olga L. Moreno Samper,
Agente Oficial.

Figura 3

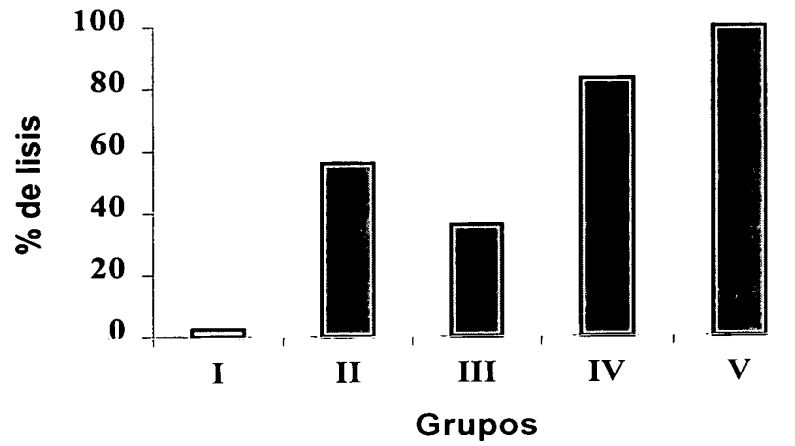
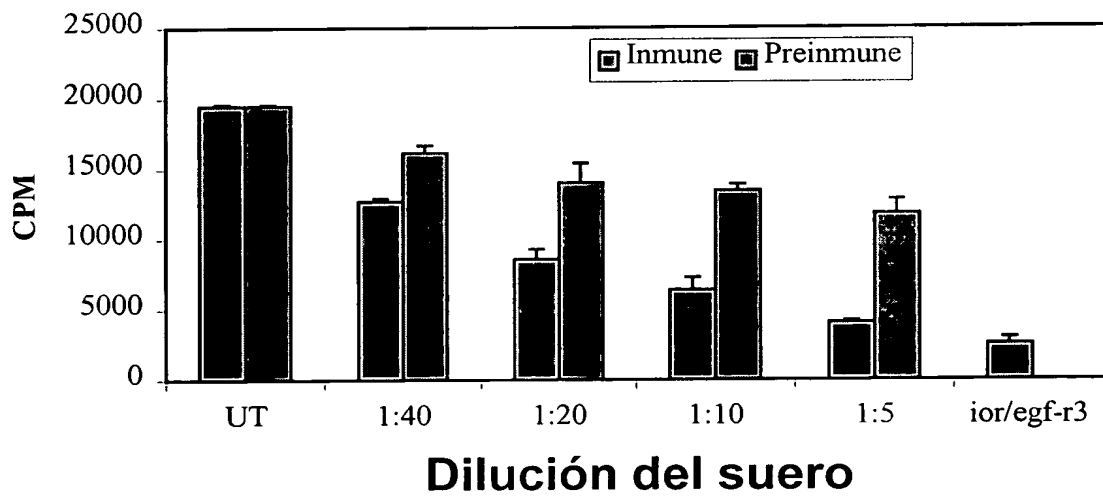
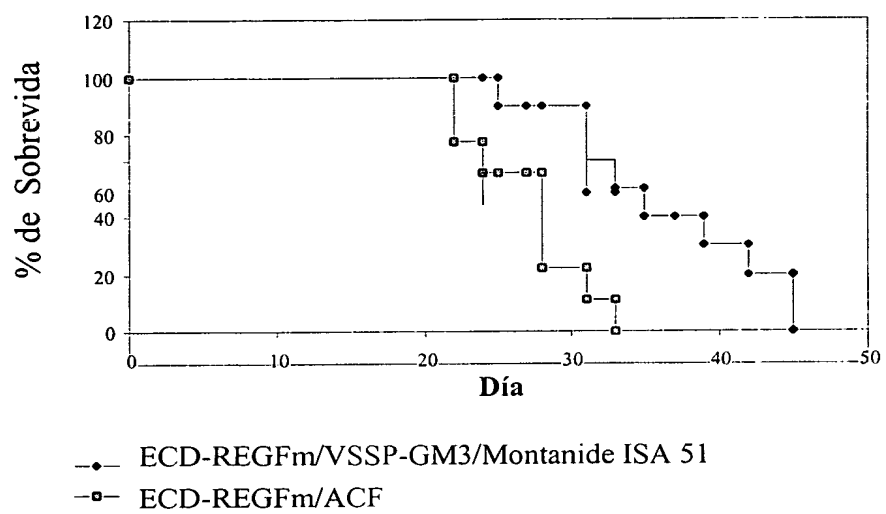


Figura 4




Olga L. Moreno Samper,
Agente Oficial.

Figura 5




Olga L. Moreno Samper,
Agente Oficial.